

AUTOREFERAT

„Rola białek HP1 i fosforylacji histonu H3 w regulacji struktury heterochromatyny okołocentromerowej we wczesnym rozwoju zarodkowym myszy”

Autor:

mgr Maciej Meglicki

Promotor rozprawy:

dr hab. Ewa Borsuk (Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, UW)

Recenzenci:

Prof. dr hab. Anna Ciemerych-Litwinienko (Zakład Cytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, UW)

dr hab. Zbigniew Polański (Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytut Zoologii, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, UJ)

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Embriologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, UW

Heterochromatyna konstytutywna okołocentromerowa jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania centromerów. Wcześniejsze badania sugerują, że u ssaków istotne znaczenie w warunkowaniu struktury i funkcji heterochromatyny okołocentromerowej, mogą mieć dwie izoformy białka HP1 (ang. *heterochromatin protein 1*), HP1 α i HP1 β . W fibroblastach mysich i ludzkich obie te izoformy występują razem w heterochromatynie okołocentromerowej przez całą interfazę i odłączają się od niej w trakcie podziału mitotycznego. Przed kolejną interfazą przyłączają się one ponownie do domen okołocentromerowych. Wykazano, że taka lokalizacja białek HP1 α i HP1 β jest warunkowana przez trimetylację lizyny 9 histonu H3 i fosforylację seryny 10 histonu H3.

Podczas oogenezy, dojrzewania meiotycznego i na początku rozwoju zarodkowego myszy dochodzi do gwałtownych przemian morfologicznych i funkcjonalnych chromatyny. Badania prowadzone w ostatnich latach pokazują, że równie gwałtowne zmiany zachodzą w tym czasie w strukturze i aktywności transkrypcyjnej jej specyficznej części, jaką jest heterochromatyna okołocentromerowa. Wydają się być one kluczowe dla prawidłowego przebiegu dalszych etapów rozwoju zarodkowego. Potencjalnie istotną rolę w przemianach heterochromatyny okołocentromerowej w oocytach i wczesnych zarodkach myszy mogą pełnić białka HP1. Wiedza dotycząca rozmieszczenia i funkcji białek HP1 podczas oogenezy, dojrzewania meiotycznego i we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego myszy była fragmentaryczna. Wiadomo było, że białko HP1 β pojawia się w regionach okołocentromerowych zaraz po zapłodnieniu i jest w nich obecne przez całą interfazę podczas kolejnych cykli komórkowych aż do stadium blastocysty. Jedyne doniesienie dotyczące występowania białka HP1 α w rozwoju zarodkowym mówiło, że nie wykryto go we wczesnych interfazowych zarodkach 1-komórkowych. Wcześniej, podczas wykonywania pracy magisterskiej, opisałem lokalizację białka HP1 α w trakcie oogenezy. Pokazałem między innymi, że pojawianie się i zanikanie białka HP1 α w heterochromatynie okołocentromerowej podczas oogenezy można skorelować z aktywnością transkrypcyjną oocytów i zmianami lokalizacji domen okołocentromerowych.

W swojej pracy doktorskiej zbadałem występowanie, mechanizmy regulacji i możliwe funkcje białka HP1 α we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego. Szczególną uwagę zwróciłem na rolę fosforylacji seryny 10 histonu H3 (H3S10Ph) w warunkowaniu jego lokalizacji

podczas rozwoju zarodkowego oraz na możliwe różnice w występowaniu białek HP1 α i HP1 β podczas oogenezy, dojrzewania mejotycznego i wczesnych etapów rozwoju zarodkowego.

Głównymi celami prowadzonych przeze mnie badań było:

1. Sprawdzenie czy w ostatnich etapach oogenezy, poprzedzających zapłodnienie, heterochromatyna okołocentromerowa nabiera właściwości typowych dla zarodka 1-komórkowego, co wyraża się obecnością w nich wyłącznie białka HP1 β (bez białka HP1 α).
2. Ustalenie kiedy w rozwoju zarodkowym, i w których rejonach chromatyny, białko HP1 α pojawia się po raz pierwszy.
3. Ustalenie jakie mechanizmy w rozwoju zarodkowym odpowiadają za pojawienie się białka HP1 α i jego lokalizację.
4. Sprawdzenie czy obniżenie poziomu białka HP1 α poprzez zastosowanie metody RNAi spowoduje możliwe do zaobserwowania zaburzenia w przedimplantacyjnym rozwoju zarodka myszy.

W swojej pracy wykazałem, że:

1. Białko HP1 α jest usuwane z regionów okołocentromerowych w wyrośniętych oocytach jajnikowych w czasie, gdy następuje zatrzymanie aktywności transkrypcyjnej i kondensacja chromatyny w ich jądrach. Białko to nie występuje na chromosomach przez całe dojrzewanie mejotyczne.
2. Zanikowi białka HP1 α w wyrośniętych oocytach jajnikowych najprawdopodobniej towarzyszą przemiany strukturalne heterochromatyny okołocentromerowej.
3. Białko HP1 β występuje w regionach okołocentromerowych przez całą oogenezę, tj. w oocytach spoczynkowych, rosnących i wszystkich typach oocytów wyrośniętych. Odłącza się od chromatyny później niż białko HP1 α , a mianowicie dopiero po rozpoczęciu dojrzewania mejotycznego.
4. W interfazie I cyklu zarodkowego białko HP1 α nie występuje ani w euchromatynie, ani w heterochromatynie okołocentromerowej przedjądrzy.
5. Nieobecność HP1 α w regionach okołocentromerowych przedjądrzy zygoty nie wynika z niezdolności ich heterochromatyny okołocentromerowej do jego wiązania, lecz z braku tego białka na tym etapie życia zarodka.
5. Białko HP1 α można po raz pierwszy zaobserwować w zarodkach 2-komórkowych pod koniec fazy S. Jest to etap w życiu zarodkach, w którym po raz pierwszy formowane są skupiska heterochromatyny okołocentromerowej zwane pro-chromocentrami. Białko HP1 α lokalizuje się wtedy w heterochromatynie okołocentromerowej, zarówno tej, która nie uformowała jeszcze pro-chromocentrami jak i tej, która występuje w postaci pro-chromocentrami. Wiadomo również, że w tym czasie zachodzą znaczne zmiany w poziomie transkryptów okołocentromerowych.
7. Pojawienie się białka HP1 α w zarodkach 2-komórkowych regulowane jest na poziomie translacji przez zegar cytoplazmatyczny. Czynnikiem regulującym ilość białka HP1 α , które może przyłączyć się do heterochromatyny okołocentromerowej, jest fosforylacja seryny 10 histonu H3 (H3S10Ph).
8. W zarodkach 2-komórkowych białko HP1 α odłącza się od regionów okołocentromerowych w późnej fazie G2 i nie jest w nich wykrywane w trakcie podziału. Za odłączanie się HP1 α od tych regionów odpowiedzialna jest fosforylacja H3S10.
9. W zarodkach 4- i 8-komórkowych występowanie białka HP1 α w heterochromatynie okołocentromerowej jest zależne od faz cyklu komórkowego, tak jak w zarodkach 2-komórkowych.

10. Zależne od fazy cyklu komórkowego występowanie białka HP1 α we wczesnych zarodkach bruzdkujących różni się od obserwowanego w komórkach somatycznych, w których białko HP1 α jest obecne w regionach okołocentromerowych przez niemal całą interfazę.
11. W zarodkach 1- i 2-komórkowych interfazową fosforylację H3S10 można zaobserwować już w późnej fazie S, a więc wcześniej niż w komórkach somatycznych, gdzie jest obecna dopiero w późnej fazie G2.
12. Znaczne obniżenie poziomu białka HP1 α przy pomocy specyficznego siRNA, w późnych zarodkach 2-komórkowych nie wpływa na liczbę pro-chromocentrow i centromerów. Wydaje się, że skutkuje zmniejszeniem zdolności centromerów i heterochromatyny okołocentromerowej do odłączania się od powierzchni pseudojąderek.
13. Znaczne obniżenie poziomu białka HP1 α przy pomocy specyficznego siRNA, nie zaburza rozwoju zarodka myszy do stadium blastocysty. Ze względu na naturę procesów, w których regulację białko HP1 α może być zaangażowane, jest prawdopodobnym, że zaburzenia wynikające z obniżenia poziomu białka HP1 α w rozwoju przedimplantacyjnym, wystąpią dopiero po implantacji.

Podsumowując, wyniki przedstawione przeze mnie w rozprawie doktorskiej pokazują, że pojawienie się białka HP1 α podlega specyficznej i odmiennej niż w komórkach somatycznych regulacji. Wraz z danymi literaturowymi sugerują one, że pomimo braku zaburzeń w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków z obniżonym poziomem białka HP1 α , białko to może w tym czasie pełnić istotne funkcje, których efekty można obserwować dopiero w rozwoju poimplantacyjnym. Możliwe również, że białko HP1 β lub inne białka mogą przynajmniej częściowo kompensować brak białka HP1 α w zarodkach.